

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-316298

(P 2 0 0 0 1 - 3 1 6 2 9 8 A)

(43) 公開日 平成13年11月13日 (2001. 11. 13)

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
A61K 48/00		A61K 48/00	4B024
9/51		9/51	4B064
47/42		47/42	4C076
A61P 35/00		A61P 35/00	4C084
43/00		43/00	4H045

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全17頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-31308 (P 2001-31308)

(22) 出願日 平成13年2月7日 (2001. 2. 7)

(31) 優先権主張番号 特願2000-52525 (P 2000-52525)

(32) 優先日 平成12年2月28日 (2000. 2. 28)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 396020800
科学技術振興事業団
埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 黒田 俊一
大阪府吹田市上山田7番C-104号

(72) 発明者 谷澤 克行
大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘2-30-2

(72) 発明者 妹尾 昌治
岡山県岡山市門田文化町2-10-13

(74) 代理人 100093230
弁理士 西澤 利夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質中空ナノ粒子とそれを用いた物質運搬体、ならびに細胞への物質導入方法

(57) 【要約】

【課題】 目的とする細胞や組織に、物質(遺伝子、タンパク質、化合物等)を特異的、かつ安全に運搬、導入するための汎用的な方法を提供する。

【解決手段】 粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子とする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子。

【請求項2】 真核細胞でタンパク質を発現させて得られるタンパク質粒子に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子。

【請求項3】 真核細胞が酵母または遺伝子組換え酵母のいずれかから選択される請求項2の中空ナノ粒子。

【請求項4】 真核細胞が昆虫細胞である請求項2の中空ナノ粒子。

【請求項5】 粒子を形成するタンパク質がB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項1ないし4のいずれかの中空ナノ粒子。

【請求項6】 B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質が抗原性を減少させたB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である請求項5の中空ナノ粒子。

【請求項7】 生体認識分子が細胞機能調節分子であることを特徴とする請求項1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。

【請求項8】 生体認識分子が抗原であることを特徴とする1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。

【請求項9】 生体認識分子が抗体であることを特徴とする1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。

【請求項10】 生体認識分子が糖鎖であることを特徴とする1ないし6のいずれかの中空ナノ粒子。

【請求項11】 請求項1ないし10の中空ナノ粒子に細胞導入物質が内包されていることを特徴とする物質運搬体。

【請求項12】 細胞導入物質が遺伝子であることを特徴とする請求項11の物質運搬体。

【請求項13】 細胞導入物質がタンパク質であることを特徴とする請求項11の物質運搬体。

【請求項14】 細胞導入物質が細胞内で細胞傷害性を示すRNAseである請求項11の物質運搬体。

【請求項15】 細胞導入物質が化合物であることを特徴とする請求項11の物質運搬体。

【請求項16】 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、エレクトロポレーション法により細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載のいずれかの物質運搬体の製造方法。

【請求項17】 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、超音波法により細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載のいずれかの物質運搬体の製造方法。

【請求項18】 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子に、単純拡散法により細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載のいずれかの物質運搬体の製造方法。

【請求項19】 請求項1ないし10のいずれかの中空

ナノ粒子に、電荷を有する脂質を用いて細胞導入物質を内包させることを特徴とする請求項11ないし15記載の物質運搬体の製造方法。

【請求項20】 請求項1ないし10のいずれかの中空ナノ粒子を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法。

【請求項21】 請求項11ないし15のいずれかの物質運搬体を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法。

【請求項22】 少なくとも請求項20または21のいずれかの物質導入方法を用いて特定細胞または組織へ物質を運搬する操作を含むことを特徴とする疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この出願の発明は、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されている中空ナノ粒子に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、特定の細胞および組織に物質を導入するための運搬体として使用することができる中空ナノ粒子に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。とくに、ドラッグデリバリーシステム(DDS)と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所では有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

【0003】また、最近の分子細胞生物学の分野においても特定細胞への遺伝子導入は必要不可欠な技術として盛んに研究されている。さらに、ヒトゲノム計画の進展により各種疾患の遺伝的な背景が明らかになりつつある現在、このような細胞および組織に対する特異性の高い遺伝子導入法が確立されれば遺伝子治療の分野での応用も可能となる。

【0004】細胞に遺伝子を導入する方法としては、これまでに、遺伝子を巨大分子化してエンドサイトーシスによって遺伝子を取込ませる方法(リン酸カルシウム法、リポフェクタミン法)や、電気パルス刺激により、細胞膜に穿孔を開け、遺伝子を流入させる方法(エレクトロポレーション法、遺伝子銃法)が知られており、いずれも今日では分子生物学的実験において、一般的に実施されている手法である。

【0005】これらの方法は簡便であるが、細胞を直接、物理的に傷つけ、遺伝子導入部位を外科的に露出させる必要があるため、生体内部の細胞や組織には容易に適用できない。また、100%近い導入率を得ることは難しい。

【0006】一方、安全性の高い物質導入方法としては

リボソーム法が知られている。この方法は、細胞を傷つけることがないため、生体内部の細胞や組織にも適用することが可能である。しかし、単純な脂質であるリボソームに高度な細胞および組織特異性を付与することは困難であり、さらに、in vivoでの遺伝子導入率は、要求される値に比べてはるかに低いという問題がある。

【0007】最近になって、ウィルスDNAに目的の遺伝子を組み込み、感染性ウィルスを生成して遺伝子導入を行う技術が開発された。この方法は導入部位を露出する必要がなく、個体にも応用でき、導入効率も100%近い画期的な方法として注目されるが、ウィルスが広範囲の細胞に非特異的に感染するため目的の細胞以外にも遺伝子が導入されてしまうという重大な問題がある。また、ウィルスゲノム本体が染色体に組み込まれ、将来予期できぬ副作用を引き起こす可能性があるため、実際には疾病の初期治療等には用いられず、末期症状の患者に適用されるに留まっているのが現状である。

【0008】そこで、この出願の発明は、以上のとおり事情に鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的、かつ安全に運搬、導入するための汎用的な方法を提供することを課題としている。

【0009】**【課題を解決するための手段】**この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、まず第1には、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を提供する。

【0010】第2には、この出願の発明は、真核細胞でタンパク質を発現させて得られるタンパク質粒子に生体認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を提供する。

【0011】第3には、この出願の発明は、真核細胞が酵母または遺伝子組換え酵母のいずれかから選択されること、および第4には、真核細胞が昆虫細胞であることを前記第2の発明の中空ナノ粒子の態様として提供する。

【0012】また、第5には、この出願の発明は、粒子を形成するタンパク質がB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である前記のいずれかの中空ナノ粒子を提供する。さらに、この出願の発明は、第6には、該B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質が抗原性を減少させたB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である前記の中空ナノ粒子を提供する。

【0013】この出願の発明は、また、第7には、生体認識分子が細胞機能調節分子であること、第8には、生体認識分子が抗原であること、第9には、生体認識分子が抗体であること、第10には、生体認識分子が糖鎖であることを前記のいずれかの中空ナノ粒子の態様として提供する。

【0014】第11に、この出願の発明は、さらに、前記のいずれかの中空ナノ粒子に細胞導入物質が内包されていることを特徴とする物質運搬体をも提供する。

【0015】また、この出願の発明は、第11の発明の物質運搬体において、第12には、細胞導入物質が遺伝子であること、第13には、細胞導入物質がタンパク質であること、第14には、細胞導入物質が細胞内で細胞傷害性を示すRNAaseであること、第15には、細胞導入物質が化合物であることを態様として提供する。

【0016】さらに、この出願の発明は、前記第11ないし第15の発明のいずれかの物質運搬体の製造方法として、第16には、前記第11ないし第15のいずれかの中空ナノ粒子に、エレクトロポレーション法により細胞導入物質を内包させること、第17には、超音波法により細胞導入物質を内包させること、第18には、単純拡散法により細胞導入物質を内包させること、第19には、電荷を有する脂質を用いて細胞導入物質を内包させることを提供する。

【0017】そして、第20には、この出願の発明は、前記第1から第10の発明のいずれかの中空ナノ粒子を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法を、第21には、前記第11から第15のいずれかの物質運搬体を用いることを特徴とする細胞または組織への物質導入方法を提供する。

【0018】そしてさらに、第22には、この出願の発明は、少なくとも前記のいずれかの物質導入方法を用いて、特定細胞または組織へ物質を運搬する操作を含む疾患の治療方法をも提供する。

【0019】**【発明の実施の形態】**この出願の発明の中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子を導入することによって、目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することを可能とするものである。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウィルスから得られるサブウィルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウィルス（Hepatitis B Virus: H.B.V）表面抗原タンパク質等が例示される。

【0020】また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、酵母や遺伝子組換え酵母、昆虫細胞等が適用できる。

【0021】発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で前記H.B.V表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたH.B.V表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの

楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している (J. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992)。このような粒子は、HBVゲノムやHBVタンパク質を全く含まないので、ウィルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

【0022】このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

【0023】一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞の系はバキュロウィルスを用いた系で、ウィルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的に行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入することで、折角培地中に分泌されても精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウィルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものがInvitrogen社により開発され、市販されている。したがって、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造をも再現されたタンパク質粒子が得られる。

【0024】この出願の発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変したり、種々の物質 (DNA、RNA、タンパク質、ペプチド、および薬剤等) を粒子内に導入することにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

【0025】もちろん、粒子形性能を有するタンパク質は、前記のB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウィルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウィルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを生体認識分子として用いてもよい。

【0026】粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子としては、たとえば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。これらは、目的

とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。

【0027】この出願の発明では、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子に、目的細胞または組織に導入したい物質 (細胞導入物質) を内包させることによって、細胞特異性を有する物質運搬体が得られる。この物質運搬体に内包される細胞導入物質とは、例えばDNA、RNAなどの遺伝子、天然あるいは合成タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド、薬剤、天然あるいは合成化合物など、どのようなものであってもよい。

【0028】具体的には、既に発明者らにより報告されたヒトRNase1 (Jinno H, Ueda M, Ozawa S, Ikeda T, Enomoto K, Psarras K, Kitajima M, Yamada H, Seno M Life Sci. 1996;58(21):1901-8) またはRNase3 (別名ECP: eosinophil cationic protein; Mallorqui-Fernandez G, Pous J, Peracaula R, Aymami J, Maeda T, Tada H, Yamada H, Seno M, de Llorens R, Gomis-Ruth FX, Coll M; J Mol Biol. 2000 Jul 28;300(5):1297-307.) 等が適用される。これらのタンパク質は、細胞外で作用させても細胞傷害活性を示さないが、細胞内に取り込まれると細胞傷害活性を示すことが分かっている。そこで、これらのRNaseを内包させた本願発明の物質運搬体を用いれば、細胞や組織に選択的に細胞傷害活性のあるタンパク質の強制発現を行うことができ、新しい癌治療方法として期待される。

【0029】また、これらの細胞導入物質を上記の中空ナノ粒子に導入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。たとえば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、あるいは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。

【0030】そして、これらのタンパク質中空ナノ粒子、あるいは物質運搬体を用いて、invivoあるいはin vitroで細胞、または組織に特異的に物質を導入することが可能となる。さらには、前記のRNaseを用いた例のように、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子や物質運搬体を用いて、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

【0031】以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

【0032】

【実施例】以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウィルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図1の模式図に示すように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク

質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸(pre-S2 peptide)が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸(pre-S1 peptide)が付加したものである。

【0033】HBsAg Lタンパク質のPre-S領域(pre-S1, pre-S2)は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

【0034】真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

【0035】以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図2に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

実施例A 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

発明者らによって報告されたJ. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992記載の方法に基づいて、pGLDLIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母(Saccharomyces Cerevisiae AH22R株)を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、HBsAg Lタンパク質粒子を発現させた。(図2a, b)定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent(Pierce Chemical Co.製)を用いて、whole cell extractを準備し、下デシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離して、銀染色によって試料中のHBsAgの同定を行なった。

【0036】これより、HBsAgは分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

実施例B HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量26g)をbuffer A溶液(7.5M尿素、0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.2、15mMEDTA、2mMPMSF、0.1%Tween80)100mlに懸濁し、グラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した。(図2c, d)

(2) 次に、上清を0.75倍容の33%(w/w)PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離(7000rpm、3.0分間)を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

【0037】(3) 再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンブロット法(Western Blotting)(1次抗体は、anti-HBsAgモノクローナル抗体)によりHBsAgを含む画分を同定した。さらに、HBsAgを含む画分をTween80を含まないbuffer A溶液で透析した。

【0038】(4) (3)で得られた透析液(1.2ml)を5~50%の勾配をかけたショ糖に重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後、(3)と同様に、HBsAgを含む画分を同定し、HBsAgを含む画分を尿素とTween80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した。(2)~(4):図2e)

(5) (4)と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター(Ultra Filter)Q2000(アドバンテック社製)を用いて濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。(図2f)CsCl平衡遠心分離後のウェスタンブロット(3)の結果から、HBsAgは、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることが分かった。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HBsAg粒子を得た。

【0039】一連の精製過程における画分を銀染色SDS-PAGEで解析した。また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5)で得られたHBsAg粒子を37℃で12時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行い、銀染色により同定を行なった。

【0040】その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

実施例1 ヒト肝癌細胞HepG2におけるHBsAg粒子による遺伝子導入

指数増殖期にあるヒト肝癌細胞HepG2を 1×10^5 cells/wellになるように、3~5cmガラス底皿シャーレに植菌し、37℃、5%CO₂存在下で10%ウシ胎児血清を含むD-MEMを用いて一晩培養した。翌日、HBsAg粒子と緑色蛍光タンパク質発現プラスミド(GFP expression plasmid pTB701-hGFP)を混合し、エレクトロポレーションを行なった後、この試料をHepG2培養液へ混合し、37℃、5%CO₂存在下で4日間培養した。

【0041】HepG2内でのGFPの発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。

【0042】HepG2を用いてHBsAg粒子の遺伝子導入効率を評価した。間隔4mmのキュベットを使用して、110V、950μFの条件でエレクトロポレーションを行なったHBsAg-プラスミドをHepG2

へ形質移入させ、37℃、5%CO₂存在下でD-MEMを用いて4日間培養した。

【0043】HepG2の共焦点レーザー写真を図3に示した。図3(a)を図3(b)、(c)と比較すると、図3(a)は図3(b)の約200倍の効率を示しており、HBsAg粒子によるGFP expression plasmidの導入効率は非常に高いものであることが分かった。

実施例2 HepG2以外のヒト肝癌細胞におけるHBsAg粒子による遺伝子導入

実施例1に記載の方法に従って、ヒト肝癌由来細胞としてHuH-7(JCRB0403)およびNUE(防衛医科大学校寄生虫学講座 多田隈卓史教授より分譲)を準備した。

【0044】また、陰性対照として、ヒト大腸癌由来細胞WiDr(ATCC CCL-218)、HT29(ATCC HTB-38)、SW1116(ATCC CCL-233)、ヒト悪性黒色腫由来細胞SEKI(JCRB0620)、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431(JCRB9009)を、それぞれ3.5cmガラス底皿シャーレ上に培養し、GFP発現プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))8ngを含むHBsAg粒子を10⁵細胞に感染させ、4日間培養を継続した。その後、各細胞内でのGFPの発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

【0045】その結果、HuH-7及びNUE細胞で、HepG2細胞と同程度の蛍光が観察された(図4)。

【0046】一方、ヒト肝臓由来でない細胞では、いずれもGFPの蛍光が観察されなかった。

【0047】以上より、この発明のHBsAg粒子を用いて、培養細胞レベルで、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子を導入できることが示された。

実施例3 ヒト肝癌を移植したヌードマウスに対するHBsAg粒子による遺伝子導入

胆癌マウスは、ヌードマウス(系統: BALB/c nu/nu、微生物学的品質: SPF、性別: オス5週齢)の両側背部皮下に、実施例2で使用したヒト腫瘍株(HuH-7及びWiDr)をそれぞれ1×10⁷細胞皮下に注射し、移植腫瘍が直径2cm程度の固形癌になるまで2~6週間生育させて得た。

【0048】実施例2に記載した方法により得たGFP発現プラスミド(pEGFP-F)2.5μgを含むHBsAg粒子10μgを、マウス腹腔内に26G注射針を使用して投与した。投与後4日目にマウスを屠殺し、腫瘍部、肝臓、脾臓、腎臓、腸管を摘出し、GFP用樹脂包埋キット(Technovit7100)を用いて組織を固定・包埋した。

【0049】具体的には、固定は4%中和ホルムアルデヒドに浸漬して行い、脱水は70%EtOHで室温2時間、96%EtOHで室温2時間、100%EtOHで室温1時間、予備浸漬は100%EtOH/Technovit7100等量混合液で室温2時間行った。その後、Technovit

7100で室温24時間以内の浸漬を行い、取り出した後、室温で1時間および37℃で1時間静置して重合反応させた。

【0050】常法に従って、切片を作製し、同時にヘマトキシエオリン染色(一般的な組織染色)を行って、蛍光顕微鏡によりHBsAg粒子投与群と非投与群のGFPによる蛍光を比較した(図5)。

【0051】図5より、ヒト肝癌由来HuH-7細胞による胆癌マウスの腫瘍部にGFPに由来する蛍光を認めた。しかし、同マウスより同時に摘出した肝臓、脾臓、腎臓、腸管には蛍光を認めなかった。さらに、ヒト大腸癌由来WiDr細胞による胆癌マウスの腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、腸管及び、HBsAg粒子非投与群にも蛍光を認めなかった。

【0052】以上より、HBsAg粒子を用いることにより、実験動物レベルでも、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率で遺伝子導入が可能であることが示された。したがって、この発明の物質運搬体は、極めて有効であることが確認された。

実施例C 生体認識分子提示用汎用型HBsAg粒子(HBsAg-NuII粒子)の作製

HBsAg粒子はヒト肝細胞特異的に感染することができるが、その高い感染性を担う同粒子表面に提示されている肝細胞認識部位は、pre-S1領域の3から77アミノ酸残基に含まれていることが判明している(Le Seyec J, Chouteau P, Canine I, Guguen-Guillouzo C, Gripon P., J. Virol. 1999, Mar; 73(3): 2052-7)。

【0053】ここでは、HBsAg粒子の粒子形成能を保ちながら、肝細胞に対する高い感染能を欠失し、かつ任意の生体認識分子を粒子表面に提示することができる改変HBsAg粒子(以降HBsAg-NuII粒子と呼称)の作製法を記す。

【0054】実施例Aに記載されたpGLDLIP39-RcTプラスミドのヒト肝細胞認識部位をコードする遺伝子領域を欠失させ、同時に制限酵素NotIサイト(gcggcgc)を挿入するために、配列番号1のオリゴヌクレオチドと配列番号2のオリゴヌクレオチドをPCR用プライマーとして使用して、QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene社)を用いたPCR法をpGLDLIP39-RcTプラスミドに対して行った。

【0055】具体的には、耐熱性DNAポリメラーゼとしてPfu DNA polymerase(Stratagene)を用い、PCRスケジュールは、95℃30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃30分間の合成反応を30回繰り返した。その後、PCR産物を制限酵素DpnIで処理し、大腸菌DH5αに形質転換し、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列から変異導入されたpGLDLIP39-RcTプラスミドを選抜した。(以下、pGLDLIP39-RcT(nuII)と呼

ぶ)。

【0056】実施例A記載の方法で、pGLDLHP39-RcT(nu11)プラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養し、HBsAg-Nu11粒子を発現させた。

【0057】定常成長期(培養開始から72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical社製)を用いて菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗Sモノクローナル抗体(フナコシ社)を用いる Western法によりHBsAg-Nu11の同定を行った。

【0058】これより、HBsAg-Nu11は分子量約42kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0059】さらに、実施例Bに記載の方法に従って、培地2:5L由来の上記菌体(約26g)から、約3mgの精製HBsAg-Nu11粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができるAuszyme11-EIAキット(ダイナボット社)を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg-Nu11粒子のS抗原性(HBsAgの粒子化度合い)を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

実施例4 ヒト由来癌細胞におけるHBsAg-Nu11粒子による遺伝子導入

実施例2に記載の方法に従って、実施例Cで得られた肝細胞に対する高い感染能を欠失し、かつ任意の生体認識分子を粒子表面に提示することができるHBsAg-Nu11粒子内部にEGFP発現用プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を封入し、He-pG2細胞と実施例2に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

【0060】しかし、いずれの細胞からもEGFPによる蛍光は観察されなかった。このことから、HBsAg-Nu11粒子がヒト肝臓由来細胞に対する高い感染能を消失していることが示された。

実施例5 ヒト由来癌細胞を移植したヌードマウスに対するHBsAg-Nu11粒子による遺伝子導入

実施例3に記載の方法に従って、ヒト腫瘍株(HuH-7及びWiDr)を移植した胆癌マウスを作製し、EGFP発現プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を含むHBsAg-Nu11粒子を投与したが、腫瘍部、及び全ての主要臓器においてEGFPによる蛍光は観察されなかった。

【0061】このことから、HBsAg-Nu11粒子があらゆる臓器に対して感染性を有さないことが確認された。

実施例D 上皮成長因子(EGF: Epidermal Growth Factor)提示型HBsAg粒子(HBsAg-EGF粒子)の作製

EGF受容体は極めて多くの細胞が細胞表層に発現していることが知られており、特にある種の癌(食道癌、大腸癌等)の増悪に関係していることが分かっている。そこで、EGF受容体を標的とするHBsAg粒子を作製すれば、EGF受容体を発現する癌組織に対する有効な治療手段になると考えられる。

【0062】ここでは、実施例C記載の方法によるHBsAg-Nu11粒子を基にした、EGF提示型HBsAg粒子(HBsAg-EGF粒子)の作製法を記す。ヒト由来EGF前駆体cDNA断片(Bell GI, Fong N, M, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, Rall LB, Sanchez-Pescador, R. Nucleic Acids Res. 1986 Nov. 11;14(21):8427-46)を鋳型として、成熟型ヒトEGF領域(53アミノ酸残基)をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。

【0063】用いた2種類のPCRプライマーは、センス側が配列番号3のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号4のオリゴヌクレオチドで、両方とも5'末端側に制限酵素NotIサイト(gcggccgc)を有するように設計した。

【0064】PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンド(約170bp)を回収し、TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いてpCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen社)にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素NotIで切断して、約170bpの目的DNA断片を回収し、pGLDLHP39-RcT(nu11)を制限酵素NotIで開裂させたものとTaKaRa Ligation kit ver.2 (TaKaRa社)を用いて閉環結合させ、大腸菌DH5αを形質転換した。

【0065】塩基配列解析により選抜を行い、挿入したEGF遺伝子がHBsAg遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドをpGLDLHP39-RcT-EGFと命名した。

【0066】実施例Aの方法に基づいて、pGLDLHP39-RcT-EGFプラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養して、HBsAg-EGF粒子を発現させた。

【0067】定常成長期(培養開始から72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical社製)を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離して、銀染色並びに抗ヒトEGFポリクローナル抗体(Santa Cruz社)を用いるWestern法によりHBsAg-EGFの同定を行った。

【0068】これより、HBsAg-EGFは分子量約50kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0069】実施例Bに記載の方法に従って、培地2:5L由来の上記菌体(約26g)から、約3mgの精製HBsAg-EGF粒子を得た。HBsAgの粒子構造

のみを検出することができるAuszyme II EIAキット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg粒子およびHBsAg-EGF粒子のS抗原性（HBsAgの粒子化度合い）を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

【0070】したがって、HBsAg-EGF粒子がHBsAg粒子と同様に得られていることが示された。

実施例6 ヒト由来癌細胞におけるHBsAg-EGF粒子による遺伝子導入

実施例2に記載の方法に従って、HBsAg-EGF粒子内部にGFP発現用プラスミドpEGFP-Fベクター（Clontech社）を封入し、HepG2細胞及び実施例2に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

【0071】その中で、EGFレセプターを大量に細胞表面に発現しているA431細胞においてGFPによる強い蛍光を観察することができた。

【0072】これより、HBsAg-EGF粒子がEGFレセプター発現細胞に対する高い感染能を有することが確認された。また、培養細胞レベルで改造HBsAg

実施例7 ヒト由来癌細胞を移植したヌードマウスに対するHBsAg-EGF粒子による遺伝子導入

実施例3に記載の方法に従って、ヒト腫瘍株（A431、HuH-7、WiDr）を移植した胆癌マウスを作製し、GFP発現プラスミド（pEGFP-F（Clontech社））を含むHBsAg-EGF粒子を投与したところ、A431による腫瘍部に強力なGFPによる蛍光が観察された。一方、他細胞による腫瘍部及び主要臓器においてはGFPによる蛍光は観察されなかった。

【0073】これより、HBsAg-EGF粒子がEGFレセプターを著量発現している細胞に特異的に感染できること、および主要臓器に対しては感染性を有していないことが確認された。

【0074】したがって、任意の生体認識分子を融合もしくは付加したHBsAg-NuI粒子は、実験動物レベルでも、あらゆる組織及び臓器に物質を特異的に運搬できる粒子となることが示された。

実施例E ベータセルリン（BTC:Betacellulin）提示型HBsAg粒子（HBsAg-BTC粒子）の作製
BTCはEGFファミリーの一種であるが、発現部位はEGFと異なる。特に、血糖調節機構に重要な役割を担う膵臓内ランゲルハンス島β細胞の分化に重要な役割を担うことが判明している。そこで、BTC受容体を標的とするHBsAg粒子を作製すれば、BTC受容体を発現する組織に対する有効な物質運搬手段とすることができ、β細胞に起因する糖尿病の治療にも役立つことが期待される。

【0075】ここでは、実施例C記載の方法によって作製されたHBsAg-NuI粒子を基に、BTC提示

型HBsAg粒子（HBsAg-BTC粒子）の作製法を記す。

【0076】ヒト由来BTC前駆体cDNA断片（Sasada R, Ono Y, Taniyama Y, Shing Y, Folkman J, Igashi K; Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993 Feb 15; 190(3):1173-9.）を鋳型として、BTC受容体に結合能を示すことが知られている部分（GHFSR-----VDLFYの48アミノ酸残基）をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。

【0077】用いた2種類のPCRプライマーは、センス側が配列番号5のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側は配列番号6のオリゴヌクレオチドで、両方とも5'末端側に制限酵素NotIサイト（gcggccgc）を有するように設計した。

【0078】PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンド（約160bp）を回収し、TOPO TA Cloning kit（Invitrogen社）を用いてpCR2.1-TOPOベクター（Invitrogen社）にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素NotIで切断して、約160bpの目的DNA断片を回収し、pGLDLIIP39-RcT（nuI）を制限酵素NotIで開裂させたものとTaKaRaLigation kit ver. 2（TaKaRa社）を用いて閉環結合させ、大腸菌DH5αを形質転換した。塩基配列解析により選抜を行い、挿入したBTC遺伝子がHBsAg遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドをpGLDLIIP39-RcT-BTCと命名した。

【0079】実施例Aと同様の方法でpGLDLIIP39-RcT-BTCプラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養し、HBsAg-BTC粒子を発現させた。

【0080】定常成長期（培養開始から72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical社製）を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗BTCポリクローナル抗体（岡山大学工学部妹尾氏作製）を用いるWestern法によりHBsAg-BTCの同定を行った。

【0081】これより、HBsAg-BTCは分子量約50kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0082】実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体（約26g）から、約3mgの精製HBsAg-BTC粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができるAuszyme II EIAキット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg-BTC粒子のS抗原性（HBsAgの粒子化度合い）を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

実施例8 ヒト由来癌細胞におけるHBsAg-BTC粒子による遺伝子導入

実施例2に記載の方法に従って、HBsAg-BTC粒子内部にGFP発現用プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を封入し、BTCレセプター発現しているラット脾臓由来細胞AR42J、BTCレセプターを発現していないヒト肺癌由来H69細胞、さらには、実施例2に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

【0083】その中で、BTCレセプターを大量に細胞表面に発現しているAR42J細胞においてGFPによる強い蛍光を観察することができた。これより、HBsAg-BTC粒子がBTCレセプター発現細胞に対する高い感染能を有することが確認された。

実施例F 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF:basic fibroblast growth factor)提示型HBsAg粒子(HBsAg-bFGF粒子)の作製

個体内での癌組織の増殖において、癌細胞は周辺組織に対し血管誘導を促すシグナルを発することが知られている(血管新生またはangiogenesis)。これには、数多くの成長因子(別名angiogenesis factor)が関与することが知られているが、その中心的な役割を担っているのがbFGFであり、周辺組織ではbFGFレセプターが亢進しているとの報告もある(Li VW, Folkner RD, Watanabe H, Yu C, Rupnick M, Barnes P, Scott RM, Black PM, Sallan SE, Folkman J Lancet 1994 Jul 9; 344 (8915): 82-6.)。

【0084】そこで、bFGF受容体を標的とするHBsAg粒子を作製すれば、bFGF受容体を発現する組織に対する有効な物質運搬手段になると考えられ、癌周辺組織における血管新生現象の抑制を効果的に誘導する治療に役立たせることも可能である。

【0085】ここでは、実施例C記載の方法によって作製されたHBsAg-Nu11粒子を基に、bFGF提示型HBsAg粒子(HBsAg-bFGF粒子)の作製法を記す。

【0086】ヒト由来bFGF前駆体cDNA断片(Kurokawa T, Sasada R, Iwane M, Igarashi K FEBS Lett. 1987 Mar 9; 213 (1): 189-94.)を鋳型として、bFGF受容体に結合能を示すことが知られている部分(PALPED-----PMSAKSの146アミノ酸残基)をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。用いた2種類のPCRプライマーは、センス側が配列番号7のオリゴヌクレオチドと、アンチセンス側が配列番号8のオリゴヌクレオチドで、両方とも5'末端側に制限酵素NotIサイト(gcgccgc)を有するように設計した。

【0087】PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンド(約450bp)を回収し、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen社)を用いてcCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen社)にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、制限酵素NotIで切断して、約450bpの目的DNA断片を回

収し、pGLDLIP39-Rct(nu11)を制限酵素NotIで開裂させたものとTaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa社)を用いて閉環結合させ、大腸菌DH5αを形質転換した。塩基配列解析により選抜を行い、挿入したbFGF遺伝子がHBsAg遺伝子と読み取り枠が一致して融合したものを選抜し、プラスミドをpGLDLIP39-Rct-bFGFと命名した。

【0088】実施例Aと同様の方法で、pGLDLIP39-Rct-bFGFプラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養してHBsAg-bFGF粒子を発現させた。

【0089】定常成長期(培養開始から72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical社製)を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗bFGFモノクローナル抗体3H3(和光純薬)を用いるWestern法によりHBsAg-bFGFの同定を行った。

【0090】これより、HBsAg-bFGFは分子量約58kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0091】実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体(約26g)から、約2mgの精製HBsAg-bFGF粒子を得た。HBsAgの粒子構造のみを検出することができるAuszyme II ELISAキット(ダイナボット社)を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg-bFGF粒子のS抗原性(HBsAgの粒子化、度合い)を測定したところ、両者とも同等の値が観察された。

実施例9 ヒト由来癌細胞におけるHBsAg-bFGF粒子による遺伝子導入

実施例2に記載の方法に従って、HBsAg-bFGF粒子内部にGFP発現用プラスミド(pEGFP-F(Clontech社))を封入し、bFGFレセプター発現しているヒト乳癌由来細胞MDA-MB-231、bFGFレセプターを発現していないヒト扁平上皮癌由来A431細胞および実施例2に記載した各種ヒト由来癌細胞への遺伝子導入を培養細胞レベルで行った。

【0092】その中で、bFGFレセプターを大量に細胞表面に発現しているMDA-MB-231細胞においてGFPによる強い蛍光を観察することができた。これより、HBsAg-bFGF粒子がbFGFレセプター発現細胞に対する高い感染能を有することが確認された。

実施例G HBsAg粒子内部に封入するヒトRNase発現ベクターの構築

ここでは、前記RNaseを細胞内で発現させるベクターを構築した。まず、ヒトRNase1遺伝子(Seno, M., Futami, J., Kosaka, M., Seno, S. and Yamada, H. Biochim. Biophys. Acta 1218 (3), 466-468 1994)を誘

型にして配列番号 9 のオリゴヌクレオチド (XhoI サイト ctcgag を有する) と配列番号 10 のオリゴヌクレオチド (HindIII サイト aagctt を有する) をプライマーとして用いた PCR により、シグナルペプチドを含んだヒト RNase 1 (156 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (RO断片) を増幅した。

【0093】次に、ヒト RNase 1 遺伝子を鋳型にして配列番号 11 のオリゴペプチド (XhoI サイト ctcgag を有する) と配列番号 12 のオリゴペプチド (HindIII サイト aagctt を有する) を用いた PCR により、シグナルペプチドを含まないヒト RNase 1 (128 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (RM断片) を増幅した。

【0094】また、ヒト ECP 遺伝子 (Rosenberg HF, Ackerman SJ and Tenen DG. J. Exp. Med. 170 (1), 163-176 1989) を鋳型にして配列番号 13 のオリゴペプチド (XhoI サイト ctcgag を有する) と配列番号 14 のオリゴペプチド (HindIII サイト aagctt を有する) を用いた PCR により、シグナルペプチドを含んだヒト ECP (160 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (EO断片) を増幅した。

【0095】さらに、ヒト ECP 遺伝子を鋳型にして配列番号 15 のオリゴペプチド (XhoI サイト ctcgag を有する) と配列番号 16 のオリゴペプチド (HindIII サイト aagctt を有する) を用いた PCR により、シグナルペプチドを含まないヒト ECP (133 アミノ酸残基) をコードする遺伝子断片 (EM断片) を増幅した。

【0096】以上の操作により得られた RO, RM, EO, EM断片を一度 pGEM-Teasy ベクター (Promega 社) にサブクローニングした後、塩基配列を確認後、EcoRI と HindIII で切断して、上記断片を含む DNA 断片を切り離し、アガ

ロース電気泳動を用いて回収した。一方、発現ベクター pTriEx-1 (Novagen 社) を EcoRI と HindIII で開裂させたものを用意し、上記断片を TaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa 社) を用いて、それぞれ閉環結合させた。その結果、得られたプラスミドを、pTriEx-1-RO, pTriEx-1-RM, pTriEx-1-EO 及び pTriEx-1-EM と命名した。

実施例 H 培養細胞を用いたヒト RNase 発現ベクターによる細胞傷害効果

アフリカミドリサル腎臓由来 COS-7 細胞を 1×10^4 細胞ずつ 16 穴ウェルプレートの各ウェルに播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で $10\% \text{ウシ胎仔血清}$ を含む D-MEM を用いて一晩培養した。翌日、pTriEx-1-RO, pTriEx-1-RM, pTriEx-1-EO 及び pTriEx-1-EM の各プラスミドを 0, 0.2, 0.5, 1.0, $5.0 \mu\text{g}$ に分注し、 $3 \mu\text{l}$ の遺伝子導入用脂質 FuGene 6 (ロシュ社) と激しく混合し、さらに、血清を含まない D-MEM 培地 $100 \mu\text{l}$ を加えたものを各ウェルに添加した。

【0097】 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で $10\% \text{ウシ胎仔血清}$ を含む D-MEM を用いて二晩培養した。その後、MTT 溶液 [5mg/ml MTT (和光純薬) を含む PBS (リン酸塩バッファー)] を $100 \mu\text{l}$ ずつ各ウェルに加え、 37°C で 4 時間静置した後、さらに、溶解液 [0.04N 塩酸を含むイソプロパノール] を 1ml 加えて、室温で 1 時間振盪し、 570nm と 630nm の吸光度を測定した。

【0098】各サンプルは 3 連で用意し、 570nm での吸光度を 630nm での吸光度で割った値を測定値とした。結果を表 1 に示した。

【0099】

【表 1】

DNA 量 (μg)	生存率 (%)			
	RO (シグナル付)	RM (シグナルなし)	EO (シグナル付)	EM (シグナルなし)
0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.2	87.9	87.8	97.4	93.3
0.5	81.3	77.7	80.8	94.9
1	77.3	84.9	86.0	89.0
5	69.2	79.7	70.0	96.7

【0100】その結果、全ての発現系において細胞傷害誘導能が観察された。

【0101】これより、これらの RNase 発現用ベクターをこの出願の発明の各種のタンパク質中空ナノ粒子に封入すれば、細胞特異的に前記の RNase が導入され、細胞内で細胞傷害効果を発揮して有効な疾患治療法となることが期待できる。

実施例 I 無血清培養の昆虫細胞による HBsAg 粒子作製

実施例 A に記載されている遺伝子組換え酵母による HBsAg 粒子の発現は、菌体内の可溶性タンパク質の約 40% が HBsAg として産生される極めて高い効率の H

BsAg 粒子生産法であるが、精製 HBsAg 粒子を得るためには実施例 B に示すような複雑な操作が必要である。また、酵母は高等動物由来のタンパク質を発現するに適している小胞体膜等のタンパク質合成系を有しているが、下等真核生物であるため糖鎖等の高次構造は再現できないことが知られている。

【0102】そこで、以下にバキュロウィルスを介さず、無血清培養が可能な昆虫細胞系で HBsAg 粒子を作製する方法を説明する。

【0103】実施例 A に記載されている酵母用 HBsAg 発現プラスミド pGLDLIP39-RcT から、配列番号 17 のオリゴヌクレオチド (KpnI サイト ggtagc) を

有する) 及び配列番号 18 のオリゴヌクレオチド (SacI サイト ccg cgg を有する) のプライマーを用いて PCR により、ニワトリ由来リゾチーム分泌シグナルペプチド融合型 HBsAg 遺伝子断片を増幅した。

【0104】PCR 産物をアガロース電気泳動で分離し、約 1.3 kb の目的バンドを回収した後、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen 社) を用いて pCR2.1-TOPO

(Invitrogen 社) にサブクローニングし、大腸菌 DH5 α に形質転換した。塩基配列解析により目的の遺伝子が正しく組み込まれているプラスミドを選別し、その後、KpnI 及び SacI で処理して、アガロース電気泳動で分離後、約 1.3 kb の KpnI-SacI 断片をアガロース電気泳動により回収した。

【0105】次に、昆虫細胞安定発現用ベクター pIZT/V5-His (Invitrogen 社) の KpnI サイトと SacI サイトの間に上記遺伝子断片を TaKaRa Ligation kit ver. 2 (TaKaRa 社) を用いて、閉環結合させた。

【0106】塩基配列を確認した後、プラスミドを、pIZT/V5-His-HBsAg と命名した。同様に、実施例 C 記載の pGLDLIIP39-RcT (nub1) 及び実施例 D 記載の pGLDLIIP39-RcT-EGF のプラスミドから改変 HBsAg 遺伝子を抜き出し、pIZT/V5-His に挿入し、それぞれ、pIZT/V5-His-nub1 及び pIZT/V5-His-EGF と命名した。

【0107】一方、昆虫細胞 High Five 株 (BTI-TN-5B1-4; Invitrogen 社) を、約 1 ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium; Invitrogen 社) に馴化させた。次に、pIZT/V5-His-HBsAg を遺伝子導入用脂質 Insectin-Plus (Invitrogen 社) を用いて無血清培地に馴化させた High Five 株に形質転換した。その後、無血清培地で 27°C 48 時間培養し、抗生物質 zeocin (Invitrogen 社) を 400 μ g/mL 含有する無血清培地で更に細胞が confluent になるまで 4~7 日間培養した。

【0108】1500 \times g、5 分間遠心により培養上清を回収し、Auszymell EIA キット (ダイナボット社) により、培地中の HBsAg 粒子の発現測定したところ、HBsAg 粒子が発現していることが確認された。

【0109】以上の様にして得られた培養上清 1 L は、限外濾過器 (使用フィルターは UK-200; ADVANTEC 社、排除分子量 200 kDa) で濃縮した後、陰イオン交換カラム (DEAE-Toyopearl 650M、東洋ソーダ社) により均一な HBsAg 粒子 2 mg を精製することができた。

実施例 J 抗原性を減少させた HBsAg 粒子の作製
HBsAg 粒子は接種されたヒトにおいて抗 HBsAg 抗体を惹起する可能性がある。そこで、HBsAg 粒子内部の主要抗原である S タンパク質の抗原性を低下させた改変 HBsAg 粒子を作製した。

【0110】具体的には、HB ワクチン接種者でありな

がらも B 型肝炎を発症した患者から単離された HB ウイルスの変異型 (Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC; Lancet 1990 Aug 11; 336 (8711): 325-9; Chio u HL, Lee TS, Kuo J, Mau YC, Ho MS J Gen Virol 1997 Oct; 78 (Pt 10): 2639-45) を HBsAg 粒子に導入した。

【0111】実施例 A に記載される pGLDLIIP39-RcT プラスミドの S タンパク質部分の 145 番目 Gly 残基を Arg 残基に置換するため (変異部分は下線で表示) に、5'-GCTGTACAAACCTTCGGACAGAACTGCA CTGTATT CC-3' (配列番号 19) とその相補配列 5'-GGAATACAAG TGCAGTTTCCTGCGAAGGTTTGTACAGC-3' (配列番号 20) をコードする PCR 用プライマー 2 種類を使用して、QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を用いた PCR 法を pGLDLIIP39-RcT プラスミドに対して行った。

【0112】具体的には、耐熱性 DNA ポリメラーゼとして Pfu DNA polymerase (Stratagene) を用い、PCR スケジュールは、95°C 30 秒間の変性、55°C 1 分間のアニーリング、68°C 30 分間の合成反応を 30 回繰り返した。その後、PCR 産物を制限酵素 DpnI で処理し、大腸菌 DH5 α に形質転換した後、出現コロニーからベクター DNA を抽出し、塩基配列から変異導入された pGLDLIIP39-RcT プラスミドを選別した。(以下、pGLDLIIP39-RcT (G145R) と呼ぶ) 実施例 A と同様の方法で pGLDLIIP39-RcT (G145R) プラスミドを形質転換し、合成培地 High-Pi 及び 8S5N-P400 中で培養し、HBsAg (G145R) 粒子を発現させた。

【0113】定常成長期 (培養開始から 72 時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical 社製) を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGE を用いて分離し、銀染色並びに抗 S モノクローナル抗体 (フナコシ社) を用いる Western 法により HBsAg (G145R) の同定を行った。

【0114】これより、HBsAg (G145R) は分子量約 52 kDa のタンパク質であることが明らかになった。

【0115】実施例 B に記載の方法に従って、培地 2.5 L 由来の上記菌体 (約 2.6 g) から、約 20 mg の精製 HBsAg (G145R) 粒子を得た。HBsAg の S 抗原性に基づいて粒子構造のみを検出することができる Auszyme II EIA キット (ダイナボット社) を用いて、HBsAg 粒子及び HBsAg (G145R) 粒子の S 抗原性を測定したところ、前者 1 に対し後者 0.2 であった。

【0116】上記 pGLDLIIP39-RcT (G145R) プラスミドの S タンパク質部分の 129 番目 Gl

n残基をコArg残基に置換するため（変異部分は下線で表示）に、5'-GCACGATTCTGCTCGAGGAACCTCTATG -3'（配列番号21）とその相補配列5'-CATAGAGGTTCTCTGAGCAGGAATCG TGC-3'（配列番号22）をコードするPCR用プライマー2種類を使用して、QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene社）を用いたPCR法をpGLDLIIP39-RcT（G145R）プラスミドに対して行った。

【0117】具体的には、耐熱性DNAポリメラーゼとしてPfu DNA polymerase（Stratagene）を用い、PCR 10 スケジュールは、95℃30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃30分間の合成反応を30回繰り返した。

【0118】その後、PCR産物を制限酵素Dpn Iで処理し、大腸菌DH5αに形質転換した後、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列から変異導入されたpGLDLIIP39-RcT（G145R）プラスミドを選抜した。（以下、pGLDLIIP39-RcT（Q129R, G145R）と呼ぶ。）実施例Aと同様の方法で、pGLDLIIP39-RcT（Q129R, G145R）プラスミドを形質転換し、合成培地High-Pi及び8S5N-P400中で培養し、HBsAg（Q129R, G145R）粒子を発現させた。

【0119】定常成長期（培養開始から72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical社製）を用いて、菌体粗抽出液を作製し、SDS-PAGEを用いて分離し、銀染色並びに抗Sモノクローナル抗体（フナコシ社）を用いる

Western法によりHBsAg（Q129R, G145R）の同定を行った。

【0120】これより、HBsAg（Q129R, G145R）は分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかになった。

【0121】実施例Bに記載の方法に従って、培地2.5L由来の上記菌体（約26g）から、約20mgの精製HBsAg（Q129R, G145R）粒子を得た。HBsAgのS抗原性に基づいて粒子構造のみを検出することができるAuszyme II EIAキット（ダイナボット社）を用いて、HBsAg粒子及びHBsAg（Q129R, G145R）粒子のS抗原性を測定したところ、前者1に対し後者0.01未満であった。

【0122】以上より、HBsAg（Q129R, G145R）粒子は低抗原性であることが明らかになり、同粒子を使用して生体内でも安定した有効な物質運搬手段に適用できることが明らかになった。

【0123】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明によって、細胞または組織に特異的に物質を運搬、導入する運搬体として用いられる新しい中空ナノ粒子が提供される。この中空ナノ粒子は、特定細胞あるいは組織に対する強い感染機構を保持するものの、ウィルスゲノムを持たないため、安全性が高く、遺伝子治療やDDSとして広く応用できる。また、大量発現系を用いて生産することができ、産業上の利用性も高い。

【0124】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Protein hollow nano-particles, their use as specie carriers and method of introducing species to cell

<130> 01-F-005PCT

<160> 22

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 1

cgacaaggca tgggaggcgg ccgcagccct caggctcag

39

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 2

ctgagcctga gggctgcggc gcctcccat gccttgtcg

39

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

23

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 3

ggggcgccg catgaactct gattccg

<210> 4

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 4

ggggcgccgc cagcagttc ccaccattc

<210> 5

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 5

ggggcgccgc ggccatttct ctaggtgc

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 6

ggggcgccgc cgtaaaacaa gtcaactc

<210> 7

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 7

ggggcgccgc cccgccttg cccgaggatg gc

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 8

ggggcgccgc cgctcttagc agacattgga ag

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 9

ggctcgagat ggctctggag aagtctcttg

<210> 10

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

24

27

30

28

28

32

32

30

25		26
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 10		
ccaagctttt aggtagagtc ctccacag	28	
<210> 11		
<211> 29		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 11		
ggctcgagat gaaggaatcc cgggccaag	29	
<210> 12		
<211> 28		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 12		
ccaagctttt aggtagagtc ctccacag	28	
<210> 13		
<211> 28		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 13		
ggctcgagat ggttccaaaa ctgttcac	28	
<210> 14		
<211> 29		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 14		
ccaagctttt agatgggtgt atccaggtg	29	
<210> 15		
<211> 29		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 15		
ggctcgagat gagaccccca cagtttacg	29	
<210> 16		
<211> 29		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		
<400> 16		
ccaagctttt agatgggtgt atccaggtg	29	
<210> 17		
<211> 29		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220> Synthesized Oligopeptide		

27

28

<400> 17

gggtacat gagatctttg ttgatcttg

29

<210> 18

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 18

ggccgcggtt aaatgtatac ccaaagac

28

<210> 19

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 19

gctgtacaaa accctcggac agaaactgca ctgtattcc

40

<210> 20

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 20

ggaatacaag tgcagttct gtccgaagg tttgtacag c

41

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 21

gcacgattcc tgctcgagga acctctaig

29

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220> Synthesized Oligopeptide

<400> 22

catagaggtt cctcgagcag gaatcgtgc

29

【図面の簡単な説明】

【図 1】この発明の実施例における HBsAg 遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1～8は、表面抗原における各部位の働きを示している。

【図 2】この発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いた HBsAg 粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。(a) 遺伝子組換え酵母の作成、

(b) High-Pi 培地における培養、(c) 8S5N-P400 培地における培養、(d) 破砕、(e) 密度勾配遠心分離、(f) HBsAg 粒子。

【図 3】この発明の実施例において、GFP プラスミドを導入した HBsAg 粒子と HepG2 を接触させた際の HepG2 の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した

図である。(a) HBsAg 粒子使用 (プラスミド量: 8 ng)、(b) 脂質 (リボソーム) 使用 (プラスミド量: 8.00 ng)、(c) ベクターのみ (プラスミド量: 8.00 ng)。

【図 4】GFP を封入された HBsAg 粒子によって、ヒト肝癌由来細胞 (NUE) 内においても HepG2 と同程度に GFP が発現されることを表す共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。(a) HepG2 細胞、(b) NUE 細胞。

【図 5】HBsAg 粒子が、ヒト肝癌由来細胞 (HuH-7) に極めて特異的に GFP を導入できることを表す共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。

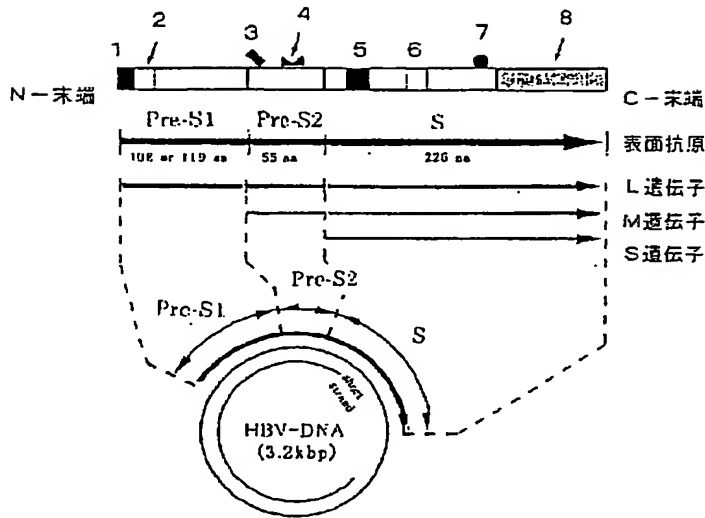
(a) ヒト肝癌由来細胞 (HuH-7) を移植された胆

癌マウスの腫瘍部（蛍光あり）、（b）マウスの通常肝臓（蛍光なし）。

【符号の説明】

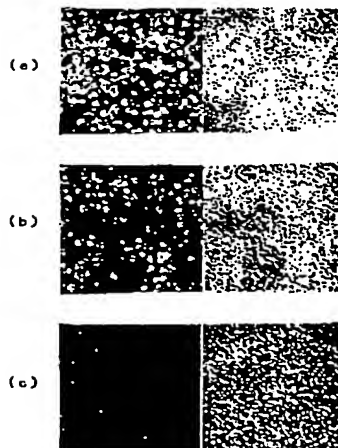
- 1 放出抑制
- 2 レセプター
- 3 糖鎖 1

【図 1】

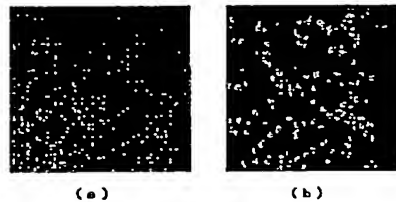


- 1 放出抑制
- 2 レセプター
- 3 糖鎖 1
- 4 血清重合アルブミンレセプター
- 5 膜貫通
- 6 安定化
- 7 糖鎖 2
- 8 膜貫通 低重合化・分泌

【図 3】

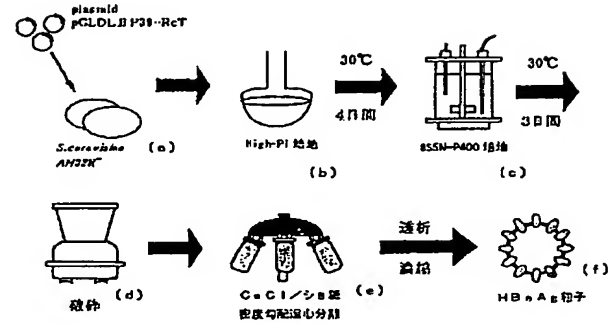


【図 4】

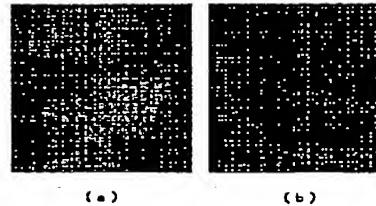


- 4 血清重合アルブミンレセプター
- 5 膜貫通
- 6 安定化
- 7 糖鎖 2
- 8 膜貫通 低重合化・分泌

【図 2】



【図 5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 0 7 K 14/02		C 0 7 K 14/02	
19/00		19/00	
// C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 P 21/02	H
C 1 2 P 21/02		IC 1 2 P 21/02	H
(C 1 2 P 21/02		C 1 2 R 1:865)	
C 1 2 R 1:865)		IC 1 2 P 21/02	H
(C 1 2 P 21/02		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(72) 発明者 近藤 昭彦		F タ-ム (参考)	4B024 AA01 BA03 BA33 CA04 DA02
兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町 1 - 2 -			DA12 EA04 GA11 GA14 HA20
806			4B064 AG13 AG33 CA06 CA10 CA19
(72) 発明者 上田 政和			CC24 DA01
東京都新宿区納戸町 6			4C076 AA65 AA95 CC27 CC29 EE41
			FF02
			4C084 AA13 NA13 NA14 ZB262
			ZC022
			4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA02
			DA20 DA21 DA86 EA20 EA34
			EA65 FA74 GA10 GA15

THIS PAGE BLANK (USPTO)